

19
2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE LA DIVERSIDAD DE METABOLITOS
SECUNDARIOS SOBRE LA DEGRADACION DE
SEMILLAS ARTIFICIALES EN UN SUELO
AGRICOLA".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

HORACIO BONFIL SANCHEZ



MEXICO, D. F.



1995

FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Efecto de la diversidad de metabolitos secundarios sobre la degradación de semillas artificiales en un suelo agrícola".

realizado por Horacio Bonfil Sánchez

con número de cuenta 8521285-1, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Francisco J. Espinosa García
Propietario	
Propietario	Dra. Ana Luisa Anava Lang
Propietario	Dra. Genoveva García Acuirre
Suplente	Biól. Rosario Vázquez Bravo
Suplente	Biól. María Cristina Duma Pérez Peves

[Handwritten signatures]
Genoveva García Acuirre
Rosario Vázquez Bravo
Cristina Pérez Peves

[Handwritten signature]
Consejo Interfacultades de Biología
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México. ¡Llevamos ya diez años juntos!

Al Dr. Francisco J. Espinosa por su apoyo y dirección durante la realización de este trabajo. En lo personal, por su amistad.

A la Dra. Genoveva García, a la Dra. Ana Luisa Anaya y a la Biól. Cristina Pérez, quienes revisaron el texto y ayudaron a mejorarlo.

A la Biól. Rosario Vázquez, buena amiga, que también revisó el texto y trabajó horas extras en el proyecto.

A la Dra. Marisa Mazari, quien me apoyó durante la realización de la tesis, y me proporcionó la cafeína necesaria para los últimos desvelos.

A la Dra. Irma Rosas, que se preocupó por la estadística.

A mi familia: mi madre, mis hermanas Paloma y Judith (y sus galanes), y mi padre, quienes mucho tienen que ver en que esto se haya terminado al fin.

A Adriana, por su preocupación y atenciones.

A los compañeros del laboratorio: Lidice, María Elena, Elia y Roberto.

A Ignacio (Nacho) Castellanos, ya biólogo él, que resolvió, con mucha neura, eso sí, algunos de los problemas estadísticos (y me generó algunos más).

A Guadalupe, a quien mucho le debo.

A mis amigos, compañeros de carrera y no, pero compañeros en buena parte del viaje: Iliana Ortega, Irene Fenoglio, María Fernanda Figueroa, Elleli Huerta, Patricia (y familia) Illoldi y a Alfredo Nava, entre otros.

Al Dr. Massoni, que también tiene parte en que esto se haya terminado.

A la gente de la Facultad de Ciencias y del Centro de Ecología, sean investigadores, profesores, alumnos o trabajadores, que de alguna manera hayan tenido que ver en mi carrera.

A Alicia Cervantes, Gloria García, Consuelo Barrientos y Patricia Reyes, por el apoyo logístico.

Este proyecto fue patrocinado parcialmente por la D.G.A.P.A. a través de una beca de tesista (proyecto IN205892), y por el C.O.N.A.C. y T. (proyecto I172-N9202).

¡Gracias!

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
INDICE	ii
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	2
3.- ANTECEDENTES	4
4.- MATERIALES Y METODO	19
4.1.- Etapa prospectiva	19
4.2.- Etapa final	20
4.2.1.- Preparación de mezclas y de semillas artificiales (cápsulas)	20
4.2.2.- Diseño experimental y preparación de matrices	27
4.2.3.- Trabajo de campo	28
4.2.4.- Trabajo de laboratorio	29
5.- RESULTADOS	30
5.1.- Primer análisis	30
5.2.- Segundo análisis	34
5.3.- Tercer análisis	36
6.- DISCUSION	48
7.- CONSIDERACIONES FINALES	53
BIBLIOGRAFIA	55

1.- RESUMEN

Se evaluó el efecto de mezclas de metabolitos secundarios vegetales incorporados a un sustrato, contra el ataque y consumo por parte de una comunidad compleja de microorganismos del suelo. La hipótesis de trabajo se basó en la afirmación de que una planta (o sus partes) que presentara una complejidad química mayor, es decir un número mayor de compuestos y/o concentraciones más altas, estaría mejor defendida que aquellas que presentarían complejidades químicas menores. Para ello se diseñó un experimento con cuarenta tratamientos químicos, resultado de algunas de las posibles combinaciones de ácido vainílico, o-vainillina, umbelliferona, cafeína, nicotina y ácido tánico. Los tratamientos diferían en composición química y concentración de compuestos y mezclas (4mg/g, 2mg/g 0.5 mg/g) Estos cuarenta tratamientos de compuestos o mezclas en tres concentraciones, se añadieron a harina de trigo refinada y se colocaron en cápsulas de gelatina para simular semillas. Cada cápsula se pesó y se colocó posteriormente en celdas de plástico selladas acomodadas en matrices de tal manera que resultó posible identificar cada cápsula individualmente en todo momento. Se hicieron un total de 25 bolsas o matrices, con tres cápsulas de cada tratamiento por matriz. Las cápsulas se perforaron una vez con ayuda de un alfiler y se enterraron en un alfalfa bien aireado y regado. Se desenterraron aleatoriamente cinco matrices por cada fecha de colecta, las cuales se realizaron a los 8, 14, 20, 26 y 32 días. Las cápsulas de las matrices se secaron y se obtuvieron los pesos. El peso inicial menos el peso final serían los parámetros utilizados para medir el efecto de los distintos tratamientos. Se esperaba que a mayor complejidad química (concentraciones más altas y mayor número de sustancias químicas) las cápsulas perdieran menos peso que las cápsulas con tratamientos menos complejos (concentraciones más bajas y menor número de compuestos). Los resultados, que se obtuvieron por medio de análisis de varianzas (ANDEVA's) de una y dos vías no apoyaron la hipótesis. Sin embargo, sugieren que la presencia de metabolitos secundarios (MS) pudiera ser benéfica para las "semillas", desacelerando su colonización inicial por la edafobiota. El beneficio aumentaría al aumentar la concentración de los MS. Después de la etapa de colonización, no hubo efecto de la presencia inicial de los MS solos o mezclados, en la velocidad de degradación de las "semillas". Es posible que una de las causas de esta falta de efecto se deba a procesos de exclusión aleloquímicos producidos por los microorganismos que colonizaron las "semillas".

2- INTRODUCCION

Las plantas están sujetas a enfermedades y plagas causadas por virus, bacterias, hongos, nemátodos, insectos, herbívoros mayores e incluso, por parte de otras plantas. Bajo la presión de selección ejercida por los consumidores, se han desarrollado patrones defensivos en las plantas. Parte de la resistencia de las plantas se debe a sus características físicas: dureza de la cutícula y la corteza, espinas, pelos, etc. (Grubb, 1992). Dentro de los patrones defensivos fenológicos se encuentran eventos importantes de la historia de vida de la planta, que tienden a ocurrir en momentos en los que la población de consumidores se encuentra baja. Otra parte de la resistencia está basada en asociaciones mutualistas con otros organismos, a los que las plantas "otorgan" alimento y cobijo a cambio de "protección" (Vasconcelos, 1993; Fiala, *et al.*, 1994). Este tipo de resistencia esta basada en binomios planta-insecto (Vasconcelos, 1993) o planta-hongo endófito (Carroll, 1988). Finalmente tenemos un tipo de mecanismos defensivos que muchos investigadores consideran como los más importantes: aquellos que se basan en la presencia de sustancias del metabolismo secundario de las plantas. Estas sustancias pueden ser tóxicas y/o repelentes al consumidor, reduciendo así el daño a la planta (Ehrlich & Raven, 1964; Rhoades, 1985; Langenheim, 1994).

Los trabajos para entender la defensa química vegetal provienen de

estudios agronómicos y de laboratorio. De estos últimos la mayoría se han centrado en el efecto de una sustancia o grupo de sustancias sobre el desempeño del consumidor. El resto se ha centrado en el efecto de mezclas de metabolitos, ya sean de la misma o de distintas familias (Berenbaum, 1985). Dentro de este grupo están los trabajos de Kubo & Hanke (1985) y de Bernays (1978), así como el de Espinosa-García y Langenheim (1991). Estos trabajos indican que algunos compuestos son más activos que otros; que la defensa se basa en una diversidad de los mismos y que la acción de las mezclas es dependiente de las dosis.

Los trabajos agronómicos señalan que la introducción de líneas puras de cultivos generan, pasado cierto tiempo, grandes epifitias. Por ello, se utilizan mezclas de cultivos ó de líneas puras de un mismo cultivar.

Con base en estos antecedentes, se hizo un trabajo experimental, donde se buscó conocer la importancia de la diversidad y la concentración de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. El experimento consistió en el ofrecimiento de una dieta artificial a una comunidad compleja de consumidores en un suelo agrícola.

3.- ANTECEDENTES.

Para crear el marco conceptual de la defensa vegetal, se ha trabajado sobre dos líneas principales de estudio. La primera, se ha orientado a la búsqueda de una explicación de la defensa vegetal en términos ecológicos y evolutivos. La segunda línea proviene de la experiencia agrícola, y se basa en estudios relacionados con la cantidad de variación fenotípica y genotípica en los cultivos, y su susceptibilidad a plagas y enfermedades.

Una de las líneas de investigación comenzó en la década de los sesenta con el trabajo de Ehrlich y Raven (1964) basado en la asociación de ciertos taxa de mariposas con plantas, cuyos resultados marcaban que los diferentes taxa de mariposas tenían preferencia por distintos taxa vegetales. La distribución de cierta familia de mariposas estaba restringida a una sola familia de plantas. Estos datos permitieron suponer a los investigadores que los perfiles químicos de las plantas, así como su asociación con las mariposas era un claro resultado de coevolución. La idea de coevolución se convirtió en eje de los estudios que siguieron.

Feeney (1976) y Rhoades y Cates (1976) elaboraron de manera independiente la hipótesis de la apariencia, la cual propone que las plantas varían en cuanto a su grado de apariencia ó predictibilidad a los herbívoros. Las plantas "aparentes" (perennes, o de amplia distribución y abundancia) según los autores, estarían defendidas por sustancias reductoras de la digestibilidad, mientras que las "no aparentes" o efímeras lo estarían por toxinas. Dentro de

las sustancias reductoras de la digestibilidad se encuentran entre otros, los taninos. Estas sustancias afectan la disponibilidad de los nutrientes para el herbívoro y crean una barrera fisiológicamente difícil de superar, y por tanto, son de utilidad tanto contra especialistas como contra generalistas. El efecto de estas sustancias es directamente proporcional a la dosis, y por tanto, deben estar presentes en altas concentraciones. Esta hipótesis asume un alto costo tanto para la síntesis como para el almacenamiento de dichas sustancias. Dentro del segundo grupo de compuestos tenemos a sustancias muy eficientes a bajas concentraciones, con blancos bioquímicos muy específicos y con costos metabólicos muy bajos, tanto para su elaboración como para su almacenamiento (toxinas que protegen a las plantas efímeras).

Los puntos débiles de la teoría de la apariencia son: 1) que sólo toma en cuenta la defensa constitutiva; 2) que está basada exclusivamente en relaciones planta-insecto; 3) que algunos compuestos pueden comportarse tanto como toxinas como sustancias reductoras de la digestibilidad y 4) que algunos herbívoros responden a toxinas de manera dependiente de la dosis (Fox, 1981; Herms & Mattson, 1992).

Antes de los trabajos de Feeney y de Rhoades y Cates, McKey (1974) había propuesto la hipótesis de la defensa óptima, que sería más tarde refinada por Rhoades (1985). Según esta hipótesis, el nivel de defensa que presenta un tejido dependerá del valor adaptativo del mismo. Las plantas "optimizan" la cantidad de metabolitos secundarios destinados a un tejido, dependiendo de la relación costo-beneficio de la asignación. Esta hipótesis es un adelanto respecto

a la anterior, pues incluye a la defensa inducida dentro de la discusión, además de que no se centra en los insectos como únicos consumidores. Ambas hipótesis suponen que la defensa es costosa, pues utiliza insumos que podrían destinarse al crecimiento y la reproducción. La hipótesis de la defensa óptima supone, además, que las partes de una planta no poseen la misma importancia evolutiva al ser unas más fácilmente sustituibles que otras.

Bryant *et al.* (1983) propusieron la hipótesis del balance carbono-nitrógeno. Según esta hipótesis, aquellas plantas que crecen en lugares ricos en luz, pero pobres en otros factores limitantes, particularmente nitrógeno, y donde son capaces de tener excedentes de fotosintatos, están defendidas por sustancias basadas en carbono (terpenos y fenoles). De manera contraria, las plantas que crecen en suelos ricos en nutrientes tendrían una mayor cantidad de metabolitos secundarios con estructura química basada en nitrógeno (alcaloides, aminoácidos no proteicos o compuestos cianogénos).

La hipótesis del balance crecimiento-diferenciación (BCD) que fue formulada en los trabajos de Loomis en 1932 y 1953, en los de Lorio en 1986 y 1988 y finalmente en los de Tuomi *et al.* en 1990 tiene algunas premisas similares a la hipótesis del balance carbono-nitrógeno. Al igual que ésta, la hipótesis BCD supone un "trueque" fisiológico entre el crecimiento y los procesos de diferenciación de una planta, entre los cuales se incluye el metabolismo secundario. Al igual que la hipótesis del balance carbono-nitrógeno, la hipótesis BCD predice que una disminución en el crecimiento, pero no en la tasa fotosintética, puede aumentar la disposición de recursos para el

metabolismo secundario. La diferencia radica en el hecho de que la hipótesis BCD no limita a uno los factores capaces de reducir el crecimiento aunque toma en menos en cuenta a la fotosíntesis que a los nutrientes. Supone además, que las condiciones de temperatura baja o sequía moderada pueden afectar también a los procesos de crecimiento y diferenciación. La hipótesis del balance carbono-nitrógeno generalmente resulta suficiente para explicar los patrones fenotípicos de los metabolitos secundarios, porque la disponibilidad de recursos es un factor limitante de gran importancia para la producción primaria en términos globales. Sin embargo, la hipótesis del balance entre el crecimiento y la diferenciación incluye a todos los factores que afectan el uso de los recursos. Por ello, provee un marco más completo para entender los patrones fenotípicos del metabolismo secundario (Herms & Mattson, 1992).

Rhoades (1985) señaló que el uso de los recursos por parte de una planta debe corresponder a la relación costo-beneficio. El costo de la defensa de una estructura no debe ser mayor al costo de la pérdida misma. Esta idea se denominó hipótesis de la defensa óptima y años más tarde fué retomada por un grupo sueco (Fangerström *et al.*, 1987), el cual formalizó el modelo al tomar en cuenta las interacciones de la defensa contra la herbivoría y el estrés ambiental, así como la formulación de las ecuaciones matemáticas involucradas en la medición de los costos. El modelo se basaba en cuatro consideraciones: la primera era que la planta en cuestión debía presentar un sistema defensivo que al aumentar su acción, redujera el nivel de herbivoría. La segunda consideración asume que el sistema defensa/herbívoro se comporta de manera tal, que una

intensidad mayor de la defensa lleva a una herbivoría menor. La tercera consideración es que la producción del sistema defensivo es costoso, en el sentido de que recursos potencialmente utilizables para el crecimiento son usados para producir defensas. Finalmente, el modelo asume que la planta se beneficia de crecer tan rápido como le sea posible, pues este crecimiento repercutirá favorablemente sobre su adecuación.

Coley *et. al.* (1985) proponen la hipótesis del crecimiento, la cual afirma que las plantas que crecen en sitios pobres en recursos (agua, luz, nutrimentos) tendrán pocas posibilidades de recuperarse de una defoliación parcial. Por tanto, invertirán mucho en defensas, particularmente en defensas no móviles como taninos o cutículas gruesas, que no se reabsorben ni se sintetizan continuamente y tampoco desaparecen de plantas senescentes. Por otro lado, las plantas que crecen en medios ricos y que pueden recuperarse rápidamente de una defoliación parcial invertirán poco en defensas, y éstas serán móviles, rápidas de sintetizar y de eliminar. Ejemplo de este tipo de defensas son los alcaloides y los terpenos.

Edwards (1989) presenta su teoría en la cual, características de las plantas que en teorías anteriores, especialmente en la de Feeney y de Coley *et al.*, son reconocidas como defensas, se les conoce como parte de una "resistencia neutral". Dentro de esta resistencia neutral se encuentran características físicas como dureza de la hojas o la presencia de taninos. Estas características pueden tener múltiples funciones, tanto fisiológicas, como de resistencia al ataque tanto de microorganismos como de animales. Lo más

cercano a una defensa contra animales, según esta hipótesis, sería la acción química de los alcaloides, terpenos y glucosinolatos. Las plantas con una mayor proporción de defensa neutral serán las más primitivas, mientras que las que presenten una mayor cantidad de defensa química serán las más recientes. Un punto interesante del trabajo de Edwards es el reconocimiento de que la evidencia que poseemos sugiere que los metabolitos secundarios de muchas especies de plantas han cambiado muy poco a través de largos períodos de tiempo. La evidencia bioquímica utilizada por Edwards indica que si bien los cambios bioquímicos que permiten a la planta entrar en una nueva zona adaptativa, pueden darse, son mucho menos comunes de lo que la teoría de la coevolución de Ehrlich & Raven exige como parte de los cambios continuos de adaptaciones y contraadaptaciones entre planta y herbívoro.

Jones & Lawton (1991) proponen ciertos mecanismos que explican la diversidad de consumidores de una planta en relación a su diversidad de metabolitos secundarios. El primer mecanismo queda explicado por medio de la hipótesis de la defensa diversificada, la cual predice una correlación negativa entre la diversidad química de la planta y la riqueza de herbívoros que sustenta, porque varios químicos deben ser más difíciles de superar que uno o dos. De manera semejante, la hipótesis de la barrera bioquímica predice baja diversidad de insectos en plantas con compuestos químicos poco usuales, porque las tasas de colonización deben reducirse en el tiempo a causa de químicos nuevos. Por otro lado, y en contra de las suposiciones anteriores, es posible que una mayor diversidad de compuestos secundarios o sustancias poco comunes en

una planta aumenten el número de herbívoros que la ataquen. La explicación de esto esta dada, según los autores, medio de dos hipótesis. La primera sería la hipótesis de la defensa con químicos comunes, según la cual, una planta con alta diversidad química aumenta sus posibilidades de compartir, al menos, algunas clases de compuestos con otras especies, facilitando el intercambio de hospedero entre los herbívoros. La segunda hipótesis se conoce como la del escape de un nuevo enemigo. Esta se basa en el hecho de que muchos enemigos naturales de insectos herbívoros utilizan características especiales de la planta para localizar a su presa. Por ello, un insecto que colonice una planta nueva ó distinta verá reducidas las posibilidades de ser parasitado ó depredado.

Para probar sus hipótesis, Jones & Lawton examinaron los reportes sobre diversidad química de las especies de la familia Umbelliferae y sobre las comunidades de insectos que las consumen. Los autores encontraron una débil correlación entre las umbelíferas con una mayor diversidad de metabolitos secundarios y una comunidad mayor de herbívoros. Estos datos son congruentes con la hipótesis de la química común. Por otro lado, no encontraron ninguna influencia de químicos especiales en la riqueza de especies. Sin embargo, estos datos deben tomarse con precaución debido a que son obtenidos a partir de bancos de información bibliográficos.

Más recientemente, Jones & Firn (1991) proponen una hipótesis que rechaza la coevolución como eje principal en el desarrollo de la defensa vegetal. Para ellos, resulta importante el hecho de que la mayoría de las plantas presente un perfil químico que comprende principalmente compuestos de baja actividad

biológica. Esto porque la posibilidad de que a partir de una mutación en una sustancia inactiva se obtenga una sustancia activa, es siempre baja. Por ello, las plantas que preserven una mayor diversidad química a lo largo de su historia, sumando las probabilidades de mutaciones que generen sustancias biológicamente importantes, tendrán una mayor posibilidad de poseer sustancias activas tanto hoy como en el futuro. El hecho de que estas plantas no sean seleccionadas negativamente a pesar de la presencia de compuestos "inútiles" se debería a que la defensa, a diferencia de lo antes pensado, no implica costos, o de tenerlos, éstos serían muy bajos. El abaratamiento en la producción de metabolitos secundarios se debe a que la mayoría de las rutas metabólicas no son lineares, sino reticulares. Así, un grupo pequeño de enzimas es capaz de producir gran cantidad de sustancias distintas.

Grubb (1992) propone que el estudio de la defensa vegetal no puede basarse, como lo ha hecho hasta ahora, en una sola característica ó estrategia defensiva. Para él, las hipótesis como la de la apariencia o la de la disponibilidad de recursos, simplifican demasiado el tema. Grubb propone que la teoría general de la defensa vegetal debe contemplar, al menos, los siguientes puntos: 1) historia de la planta; 2) presencia histórica de herbívoros en la zona; 3) disponibilidad de recursos y si ésta es o no estacional; 4) valor nutricional de la planta en relación a sus vecinas; 5) otros tipos de defensa que no sean solamente la química. Todo esto por el hecho de que la planta se encuentra ocupando un cierto nicho ecológico, y las diferentes dimensiones del mismo afectarán la defensa de la planta.

Para probar estas hipótesis se han realizado trabajos tanto en el laboratorio como en el campo. Se han tomado en cuenta, además, datos obtenidos de trabajos cuyos objetivos no estaban directamente relacionados con la teoría de la defensa vegetal, pero que han resultado relevantes para ésta. Destacan los realizados sobre grupos o familias de compuestos: terpenos (Mihaliak, *et al.*, 1991; Langenheim, 1994); furanocumarinas (Zangler & Berenbaum, 1990; Berenbaum *et al.* 1991); ácidos fenólicos (Akin *et al.*, 1988; Shafer & Blum, 1991; Pellissier, 1993); taninos ó polifenoles vegetales (Swain, 1979; Choo *et al.*, 1981; Haslam, 1988; Nichols-Orians, 1991 a, b.) y alcaloides (Robinson, 1974; Balwin & Hun, 1994), entre otros. Es importante destacar que muchos de estos trabajos tienen como marco conceptual al trabajo de Ehrlich & Raven (1964), por lo que generalmente se centran en la investigación de cierta sustancia o familia de sustancias sobre el desempeño de una especie de consumidor o un taxón de consumidores (Berenbaum, 1985). En la naturaleza, un herbívoro se enfrenta más frecuentemente a una mezcla compleja de compuestos de distintas familias químicas en mucho mayor medida que a una sola sustancia ó familia de sustancias. Los trabajos con dietas artificiales o medios de cultivo que involucran estas mezclas resultan importantes, tanto para el entendimiento de la mecánica de la defensa vegetal, como para los fines de este trabajo. Destacan los de Kubo & Hanke (1985), Bernays & Chapman (1987) y Nichols-Orians (1991 a y b). Los primeros trabajaron con tres familias de plantas: Labiatae, Podocarpaceae y Oleaceae. De cada familia se eligió una especie con actividad biológica conocida: repelente, antibiótica y antimicrobiana,

respectivamente. De las hojas de estas plantas se hicieron extracciones de compuestos químicos por medio de los métodos convencionales, y se obtuvieron cuatro fracciones de polaridad creciente. Con cada una de ellas se realizaron estudios *in vivo* y los resultados se compararon con los del extracto total. Además se identificaron las estructuras moleculares de los principales componentes. Con ello se vio que las actividades características de las plantas se deben más al número de compuestos que presentan que a la actividad de uno solo.

Bernays & Adams (citado en Berenbaum, 1985) demostraron en 1977, que las mezclas de químicos vegetales son más eficaces que los compuestos aislados. La reducción en el consumo de los discos tratados con los químicos experimentales en un bioensayo ofrecidos a un ortóptero, resultó aditiva, ya que mientras la contribución en repelencia de cada químico de manera aislada no fue detectada, el efecto colectivo sí lo fue.

Además de la variabilidad química de la planta y de la diversidad de familias químicas que presenta, la dosis en la que estos compuestos se encuentran es importante. Esta idea se viene trabajando desde la hipótesis de la apariencia de Feeney (1976) y Rhoades & Cates (1976). Dentro de los trabajos experimentales para probarlo destaca Nichols-Orians (1991). Este autor trabajó con dos tipos de taninos: solubles y condensados, y demostró que los taninos condensados inhiben más efectivamente el crecimiento de hongos. Demostró además, que la dosis es importante: a concentraciones menores de 0.0025% no aparece ninguna diferencia en la biomasa de los hongos. A mayor

concentración, dependiendo de la naturaleza del tanino, la inhibición fue desde ligera hasta la muerte de hifas en algunos casos. Otro trabajos sobre dosis en relación a la defensa química vegetal fueron el de Zucker (1983), que presenta resultados similares a los de Nichols-Orians (1991).

Así pues, la evolución de las ideas que forman el marco teórico respecto a la defensa vegetal contra ataques de consumidores, ha avanzado a escenarios cada vez más complicados. Inició con la concepción de predictibilidad que es un concepto relacionado en mayor medida con las características del consumidor que con características de la propia planta. Después se han ido incorporando características específicas de la planta como sus capacidades metabólicas y algo que podríamos llamar la herencia filogenética de las mismas en términos bioquímicos. Finalmente, se ha aceptado el hecho de que el binomio planta-consumidor no se encuentra en el vacío ecológico, sino embebido dentro de una comunidad de organismos muy compleja, la cual a su vez, afecta y es afectada por el medio. La necesidad de incorporar estos conceptos a la búsqueda de una teoría general de la defensa vegetal es un reconocimiento tácito a lo complicado del fin que se persigue.

Dentro del grupo de estudios que aportan información para la elaboración de un marco teórico de la defensa vegetal, se encuentra una gran cantidad de trabajos agrícolas, especialmente aquellos relacionados con la selección de líneas resistentes a ataques de patógenos y herbívoros, así como los relacionados a la utilización de cultivos multilíneas, en vez de cultivos homogéneos. La importancia de dichos estudios radica en el hecho de tratarse de sistemas no

naturales creados por el hombre, dentro de los cuales el "equilibrio natural" entre planta y consumidor se rompe y aparecen patrones mucho más marcados y, por tanto más claros, de los procesos, tanto defensivos como de ataque (Bradshaw & Mortimer, 1988). Dentro de los conceptos de mayor importancia aportados por este tipo de estudios están: la **resistencia gen x gen**, la cual se presenta cuando el mecanismo defensivo de la planta, así como el de ataque del patógeno, son manejados por un solo gen en cada organismo. Un cambio en el gen defensivo de la planta puede darle una ventaja adaptativa al volverla resistente al patógeno. Esta inmunidad sin embargo, podrá ejercer una fuerte presión de selección sobre la población del patógeno si la de la hospedera es homogénea, gracias a la cual y al paso del tiempo podrá aparecer una nueva raza de patógeno con un cambio en su gen (o genes) ofensivo que le dará a esta población la capacidad de infectar a la planta hasta entonces inmune. La **resistencia horizontal**, es el resultado de varios mecanismos actuando conjuntamente, los cuales están controlados por un conjunto de genes complementarios, y que resulta eficaz contra muchos patógenos; y la **resistencia vertical**, se presenta cuando los distintos mecanismos de resistencia están regulados por un gen para cada mecanismo. Este tipo de resistencia funciona contra patógenos especializados, siendo sinónimo de la resistencia gen x gen (Van der Plank, 1968; Agrios, 1991).

Los datos de mayor importancia, en relación a este trabajo, aportados por estos estudios, son aquellos relativos al uso de cultivos multilíneas. Los fitomejoradores trabajan cruzando diversas variedades de una especie de

importancia económica. Durante este proceso se seleccionan características benéficas, como el tamaño de la planta y del fruto, la resistencia a enfermedades o al estrés ambiental, etc. (Van der Plank, 1963; Browning & Frey, 1969; Namkoong, 1991). Al término del proceso, los agrónomos tienen una nueva variedad con las características seleccionadas, pero con muy baja variabilidad tanto genotípica como fenotípica. En los primeros años de esta variedad, su desempeño en el campo es muy bueno, al tener una tasa de pérdida muy baja y una tasa de producción muy alta. Sin embargo, con el paso del tiempo, la variedad seleccionada pierde resistencia y la incidencia de la enfermedad aumenta hasta, eventualmente, volverse epifítia (Kolster *et al.*, 1989). Para reducir tales daños se han desarrollado dos estrategias principales: la primera consiste en la introducción de muchos genes de resistencia a una variedad. La segunda consiste en la utilización sincrónica de muchas líneas puras en un campo de cultivo. En el segundo caso, el aumento de la cosecha logrado con las multilíneas fué mayor a la suma de los aumentos porcentuales que de manera individual otorgó cada una de las variedades (Kolster *et al.*, 1989). Además, los efectos de las mezclas en cuanto a la resistencia final otorgada, serán mayores conforme mayores sean las resistencias originales. Dos son los factores más importantes para que esto suceda: el primero es que las plantas de distinto genotipo crean una barrera física para la dispersión del inóculo. El segundo es que la diversidad de fenotipos aumenta y con ella, aumenta la variabilidad en los perfiles químicos de las plantas.

La mayor parte de los estudios expuestos hasta ahora se centran en el

estudio de las partes aéreas de la planta y sus consumidores. Sin embargo, éste no es el único caso. Las semillas y las partes subterráneas de la planta también son atacadas por una comunidad diversa de consumidores, y por tanto requieren igualmente de defensas. Las condiciones, tanto bióticas como abióticas, en las que se encuentran estas estructuras de la planta son muy diferentes a aquellas en que se encuentran las partes aéreas. La diversidad de organismos que se presentan en el suelo es muy amplia. Están presentes lombrices de tierra, termitas, hormigas, raíces de plantas superiores, nemátodos, algas de suelo, hongos, actinomicetes y bacterias (Brady, 1990), y este conjunto forma una comunidad compleja. De éstos, los organismos más importantes, tanto por número de especies -más de 670 especies, representantes de 170 géneros-, como por biomasa producida, son los hongos (Brady, 1990). Se calcula que la biomasa producida por este grupo oscila entre 1000 y 10 000 kg por hectárea x 15 cm de profundidad. (Brady, 1990). Si bien es cierto que el papel de los hongos en la ecología del suelo dista de estar plenamente conocido, queda clara su importancia en los procesos de transformación del suelo: por su capacidad degradadora son el grupo más versátil: celulosa, almidón, lignina, azúcares y proteínas son degradados por hongos (Scheffer, 1976). La presencia principalmente de hongos, pero también de todos los demás organismos, hace que las partes hipógeas de las plantas, sean éstas raíces, bulbos, tallos, cormos o semillas, se encuentren en un medio muy complejo y agresivo, contra el cual deben luchar, formar asociaciones, y/o competir. La relación de las raíces y la edafobiota, la degradación de la lignina, los cambios en la composición química

de los exudados radiculares producidos por la actividad de los microorganismos, el cambio en la densidad de las poblaciones microbianas debidos a sustancias producidas por la plantas son algunos de los temas que han sido estudiados hasta hoy (Alexander, 1980; Curl & Truelove, 1985; Shafer & Blum, 1991; Kumar *et al.*, 1993; Pellissier, 1993). Sin embargo, la amplitud del campo es mucho mayor y, por tanto, queda mucho por hacer.

Tanto de los estudios de laboratorio como de campo, es posible inferir que son varios los factores que intervienen en la defensa química vegetal. Dentro de los más importantes están la diversidad de químicos que una planta posee, las familias químicas presentes en esta diversidad, las concentraciones en las que las sustancias se presentan y el efecto que éstas tienen sobre cierto consumidor.

Partiendo de estos antecedentes y de la hipótesis de trabajo: plantas con defensas químicas más complejas serán mejor defendidas que plantas con defensas químicas menos complejas, se realizó el presente estudio experimental, cuya importancia radica en que por primera vez se presentan una serie de mezclas de compuestos defensivos ante una comunidad compleja de consumidores. En este trabajo, se entendió complejidad química como el número de sustancias químicas que presenta una planta, así como su concentración.

4.- MATERIALES Y METODO

El trabajo para probar la hipótesis, -plantas con una defensa química más compleja serán mejor defendidas que aquellas que presenten defensas químicas menos complejas-, consistió en dos etapas experimentales: un prospectiva y una final.

4.1 Etapa prospectiva.

Esta primera etapa, se realizó con el fin de conocer el tiempo de degradación de la harina de trigo en el suelo y determinar la frecuencia para el experimento final. Para esto se rellenaron 78 cápsulas de gelatina # 0 con harina de trigo refinada. Una vez rellenas, se eligieron 40 cápsulas buscando homogeneidad de peso, que se colocaron en una matriz de plástico adherente anotando las coordenadas y el peso de cada una. La matriz aislaba las cápsulas entre sí. Posteriormente se perforó cada una de las cápsulas con ayuda de una aguja. La matriz así formada se enterró en un suelo húmedo a una profundidad de 10 cm, junto a los invernaderos del centro de Ecología de la U.N.A.M. Se regó el suelo hasta su saturación con agua de la llave cada tercer día. Cada seis días se sacaba una línea de diez cápsulas, las cuales se secaron y se pesaron. Restando el peso final al del inicial, se obtuvo la pérdida de cada cápsula. Con los datos de las

DIAGRAMA DEL METODO UTILIZADO DURANTE EL EXPERIMENTO

Se elaboraron 13 mezclas de harina de trigo refinada con metabolitos secundarios de plantas. Cada una de las mezcla se elaboró en tres concentraciones (alta, media y baja), que junto con la harina sola, daban un total de 40 tratamientos.



Se rellenaron cápsulas de gelatina O con los cuarenta tratamientos.



Con las cápsulas rellenas se hicieron 25 matrices de plástico, cada una de las cuales llevaba 3 cápsulas previamente pesadas de cada uno de los 40 tratamientos, más una cápsula vacía, para un total de 121 cápsulas por matriz.



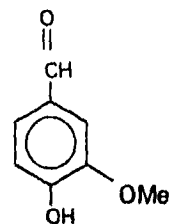
Las matrices se enterraron en un alfalfar semillero, y se recuperaron en tiempos preestablecidos (8, 14, 20, 26 y 32 días). Antes de ser cubiertas con la tierra, las cápsulas se perforaron con ayuda de un alfiler.



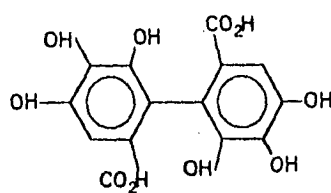
Las matrices se secaron en el laboratorio a temperatura ambiente.



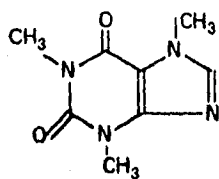
Las diferencias entre el peso inicial de las cápsulas menos el peso final, fueron los datos que se trabajaron en los ANDEVA.



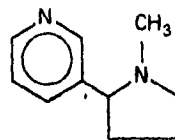
o-VANILLINA



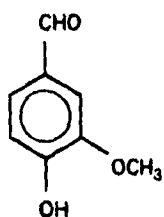
ACIDO TANICO



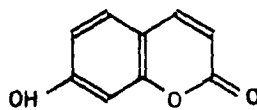
CAFEINA



NICOTINA



ACIDO VANILLICO



7-HIDROXICUMARINA
(UMBELLIFERONA)

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO.

diez cápsulas se hizo un promedio, el cual era la media de la pérdida cada seis días. Los resultados se muestran en la gráfica 1.

4.2 Etapa final

Se realizó una segunda etapa, de carácter experimental, la cual puede dividirse en cuatro fases: preparación de cápsulas, elaboración de matrices, sembrado de éstas en el campo y obtención de pesos finales.

4.2.1- Preparación de mezclas y de semillas artificiales (cápsulas): Se realizaron 40 tratamientos de harina de trigo refinada mezclada con metabolitos secundarios de plantas. Este número de tratamientos resultaba de la suma de 13 combinaciones de compuestos, multiplicados por tres concentraciones (alta, media y baja), mas un testigo (harina sola). Las mezclas utilizadas aparecen en la tabla 1 y los compuestos utilizados en la figura 1. Los distintos tratamientos aparecen en la tablas 2a, 2b y 2c.

Los metabolitos usados se eligieron por las siguientes razones: a) por estar presentes en semillas naturales; b) por haber sido objeto de estudios anteriores reportados en la literatura; c) por que la mayoría está frecuentemente en el suelo, d) por representar a dos de las familias químicas asociadas con la defensa vegetal. Los ácidos fenólicos son compuestos que han probado su eficacia en la inhibición del crecimiento de hongos en la rizósfera del pepino (Shafer & Blum, 1990), y otros hongos *in vitro* (Snook *et al.*, 1992; Pellissier, 1993).

Tabla 1.- Mezclas utilizadas en el experimento. Cada una se presentó en tres concentraciones.

MEZCLA	COMPUESTOS UTILIZADOS
1	ortho-vainillina
2	ácido vainílico
3	cafeína
4	umbelliferona
5	ácido tánico
6	nicotina
7	cafeína + o-vainillina
8	cafeína + ácido tánico
9	cafeína + umbelliferona
10	cafeína + o-vainillina + ácido tánico (tercia)
11	cafeína + o-vainillina + ác. tánico + umbelliferona (cuarteta)
12	cafeína + o-vainillina + ác. tánico + umbelliferona + ácido vainílico (quinteta)
13	cafeína + o-vainillina + ác. tánico + umbelliferona + ácido vainílico + nicotina (sexteta)
14	harina sola

Tabla 2a . Tratamientos utilizados en el experimento. Se señalan compuestos químicos utilizados y la concentración de los mismos.

MEZCLA	METABOLITOS SECUNDARIOS UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO Y SU CONCENTRACION
1	o-vainillina 4 mg/g
2	o-vainillina 2 mg/g
3	o-vainillina 0.5 mg/g
4	ácido vainílico 4 mg/g
5	ácido vainílico 2 mg/g
6	ácido vanílico 0.5 mg/g
7	cafeína 4 mg/g
8	cafeína 2 mg/g
9	cafeína 0.5 mg/g
10	umbelliferona 4 mg/g
11	umbelliferona 2 mg/g
12	umbelliferona 0.5 mg/g
13	ácido tánico 4 mg/g
14	ácido tánico 2 mg/g
15	ácido tánico 0.5 mg/g

Tabla 2 b. Tratamientos utilizados en el experimento. Se señalan compuestos químicos utilizados y la concentración de los mismos.

MEZCLA	METABOLITOS SECUNDARIOS UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO Y SU CONCENTRACION
16	nicotina 4 mg/g
17	nicotina 2 mg/g
18	nicotina 0.5 mg/g
19	cafeína + o-vainillina 4 mg/g
20	cafeína + o-vainillina 2 mg/g
21	cafeína + o-vainillina 0.5 mg/g
22	cafeína + ácido tánico 4 mg/g
23	cafeína + ácido tánico 2mg/g
24	cafeína + ácido tánico 0.5 mg/g
25	cafeína + ácido vainílico 4 mg/g
26	cafeína + ácido vainílico 2 mg/g
27	cafeína + ácido vainílico 0.5 mg/g
28	cafeína + o-vainillina + ác. vainílico 4 mg/g
29	cafeína + o-vainillina + ác. vainílico 2 mg/g
30	cafeína + o-vainillina + ác. vainílico 0.5 mg/g
31	cuarteta 4 mg/g
32	cuarteta 2 mg/g

Tabla 2 c. Tratamientos utilizados en el experimento. Se señalan compuestos químicos utilizados y la concentración de los mismos.

MEZCLA	METABOLITOS SECUNDARIOS UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO Y SU CONCENTRACION	
33	cuarteta	0.5 mg/g
34	quinteta	4 mg/g
35	quinteta	2 mg/g
36	quinteta	0.5 mg/g
37	sexteta	4 mg/g
38	sexteta	2 mg/g
39	sexteta	0.5 mg/g
40	harina sola	

Lo mismo puede decirse de las cumarinas (Zangler & Berenbaum, 1990; Snook *et al.*, 1992).

Los taninos son sustancias asociadas con la defensa de las plantas, o al menos con la resistencia neutral de las mismas (Edwards, 1989; Haslam, 1988; Nichols-Orians, 1991).

La o-vainillina es un producto de la degradación de la lignina (Mikulasova *et al.* 1990).

La nicotina y cafeína se utilizaron por pertenecer al grupo de los

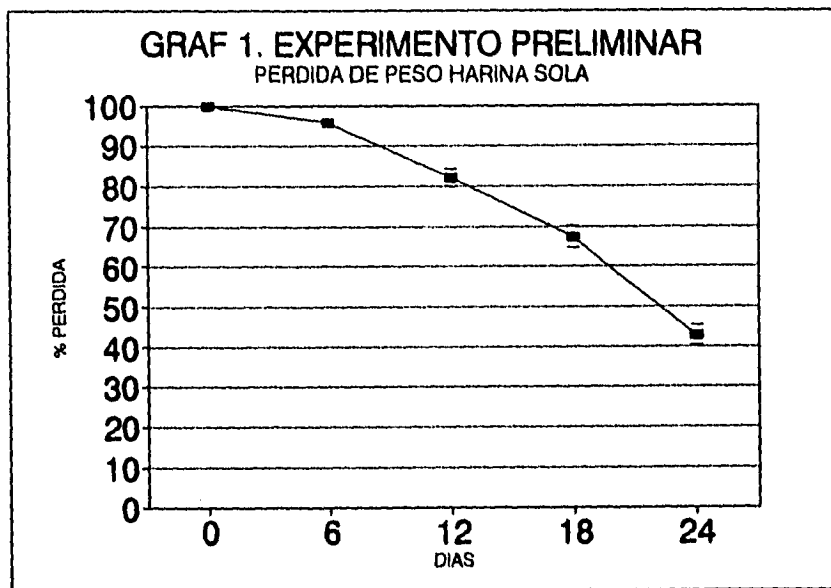
Los alcaloides se encuentran ampliamente representados en el reino vegetal y su diversidad es enorme. Su papel como sustancias tóxicas para los herbívoros ha sido probada en varios casos (Harborne, 1982). En el caso particular de la nicotina se ha demostrado que es una defensa química potente cuya producción es inducida por daño simulado o producido por herbivoría en tres especies del género *Nicotiana* (Baldwin, 1988).

Tabla 3. Cantidades de harina y de metabolitos secundarios utilizados en el experimento. Los datos son los pesos (en gramos) de los MS utilizados en cada mezcla. Los números indican la cantidad de MS utilizados en la mezcla.

Con (concentración); Harina; MS (metabolitos secundarios).

CON	Harina	MS	1	2	3	4	5	6
alta	46.08	1.92	1.92	0.96	0.64	0.48	0.384	0.32
media	47.04	0.96	0.96	0.48	0.32	0.24	0.192	0.16
baja	47.76	0.24	0.24	0.12	0.08	0.06	0.048	0.04

Los compuestos no se mezclaron con la harina utilizando disolventes, pues el ácido tánico diluído hubiera formado complejos con algunas proteínas de la harina, impidiendo una distribución homogénea. En vez de ello, a los compuestos ya pesados se les añadió una cantidad igual de harina y se mezclaron manualmente en repetidas ocasiones, para después pasarlos por el cernidor. Este procedimiento se repitió tantas veces fue necesario hasta alcanzar



GRAFICA 1. Cápsulas de gelatina rellenas con harina sin metabolitos secundarios, tardaron 24 días en alcanzar una pérdida promedio mayor del cincuenta por ciento. Los datos de este experimento permitieron determinar la frecuencia de los muestreos en la etapa medular del trabajo.

un total de 48 gr de mezcla que se hicieron para cada tratamiento (Tabla 3). Con esta cantidad se rellenaron un total de 140 cápsulas de gelatina por tratamiento. El rellenado de las mismas se hizo con ayuda de una aparato expresamente diseñado en el laboratorio de Ecología Química, del Centro de Ecología de la U.N.A.M. Con este aparato se logró hacer el trabajo más rápido y obtener cierta homogeneidad en el peso de las cápsulas.

4.2.2.- Diseño experimental y preparación de matrices: Una vez terminada la elaboración de las cápsulas, éstas se pesaron y se colocaron en unas matrices que se hicieron a partir de bolsas de plástico de 45 x 30 cm. Estas bolsas se sellaron con calor de manera longitudinal, creando 15 carriles paralelos. En cada uno de ellos se colocó una cápsula previamente pesada. Una vez colocadas las 15 cápsulas de una línea, las bolsas se sellaron transversalmente, quedando cada una de las cápsulas en una porción de la bolsa sellada por los cuatro lados. En cada matriz se colocaron tres cápsulas de cada uno de los 40 tratamientos, más una cápsula vacía. El orden de colocación de las cápsulas fue determinado al azar para cinco matrices tipo. De cada matriz tipo se hicieron cinco juegos, para un total de veinticinco matrices. Una vez terminadas las y antes de ser enterradas, las cápsulas se perforaron una vez con ayuda de una aguja, con el fin de permitir el contacto de las cápsulas con la humedad y la microbiota del suelo.

4.2.3.- Trabajo de Campo: Este se llevó a cabo en un alfalfar semillero de dos años, en terrenos del Rancho Santa Lucía, Municipio de Texcoco, Edo. de México, perteneciente al CIFAP del Valle de México, dependiente del INIFAP. El suelo del alfalfar es migajón areno-arcilloso, con 50% de arena, 32 % de arcilla y 18 % de limo. Presenta un 2.55% de materia orgánica (análisis realizado por Enrique Solís, del Laboratorio de Análisis Químicos del Centro de Ecología, U.N.A.M.). Las matrices se enterraron el 17 de junio de 1993 en el fondo de los surcos, en hoyos de 15-20 cm de profundidad y de 60 cm de longitud x 45 cm de ancho, en el interior de jaulas de acero inoxidable de 50 x 35 x 7 cm para excluir roedores. Las jaulas se colocaron abiertas en el fondo de los hoyos. En el interior de las mismas se colocó una capa del suelo removido de aproximadamente 3 cm. Sobre esta capa se colocaron las matrices con las perforaciones hacia abajo, y después se cubrieron con el suelo hasta alcanzar los 7 cm de profundidad de las jaulas. Al llegar a este punto, las jaulas se cerraron con ayuda de alambre de acero inoxidable. Después los hoyos se terminaron de llenar con el resto del suelo removido. Los hoyos se hicieron a lo largo de los surcos, cinco en cada uno de ellos. La distancia entre hoyo y hoyo fué de 10 metros, y los surcos elegidos se encontraban a tres surcos uno del otro. Los hoyos se encontraban desfasados cinco metros respecto a los hoyos del surco adyacente.

Las matrices se enterraron el 17 de junio de 1993. Se recogieron a los 8, 14, 20, 26 y 32 días en grupos de cinco matrices elegidas al azar para cada fecha.

4.2.4.- Trabajo de laboratorio: Las matrices desenterradas se llevaron al laboratorio. Se les quitó el exceso de humedad colocándolas sobre papel periódico, y después fueron secadas a la sombra y a temperatura ambiente. Una vez secas, las cápsulas fueron sacadas de su lugar en la matriz, y colocadas en bolsas de papel encerado. Dos de las tres cápsulas de cada tratamiento fueron secadas en horno durante 48 horas a 65° C. Pasado este tiempo se les pesó. En ocasiones, las cápsulas se encontraban muy deterioradas, por lo cual fue necesario secarlas junto con el plástico que las recubría. En esos casos, al peso de la cápsulas con plástico se le restó el del plástico solo, peso que fue obtenido al lavar el plástico y secarlo por 24 horas a 65° C. La tercera cápsula se mantuvo seca y a temperatura ambiente para utilizarse en estudios posteriores. Con los pesos iniciales y con los pesos obtenidos después del enterramiento, se obtuvieron los porcentajes de pérdida de cada una de las cápsulas. Los datos se analizaron por medio de análisis de varianza (ANDEVA) de una y de dos vías.

5.- RESULTADOS

Los datos presentaron homogeneidad de varianzas al ser transformados los porcentajes de pérdida mediante la raíz cuadrada del arcoseno de la proporción (Lewis, 1982), y se analizaron por medio de tres pruebas de ANDEVA: el primer análisis fue de dos vías en el cual se utilizaron las concentraciones y el número de compuestos como las variables independientes y la pérdida de peso como la variable dependiente; el segundo fue un análisis de dos vías teniendo las concentraciones y el tipo de compuestos como las variables independientes y la pérdida de peso como variable dependiente; el tercer análisis fue un ANDEVA de una vía siendo el tratamiento la variable independiente y la pérdida de peso la dependiente.

5.1.- Primer análisis.

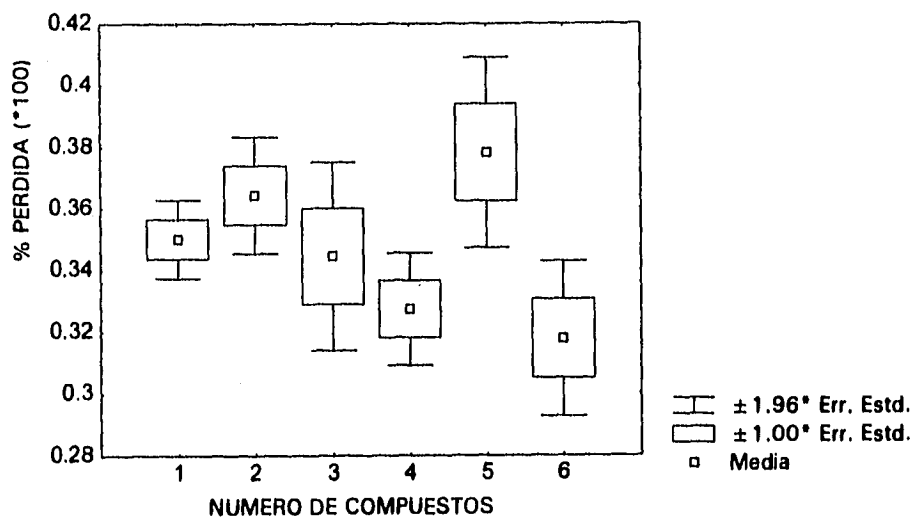
Los datos obtenidos de los cinco muestreos se analizaron por medio de un ANDEVA de dos vías. Las variables independientes fueron el número de compuestos y la concentración, mientras que la pérdida de peso se usó como variable dependiente. Los resultados (tabla 4) señalan diferencias significativas solamente en los dos primeros muestreos. En el primer muestreo resultó significativo el efecto del número de compuestos. Los tratamientos con seis compuestos tuvieron menores pérdidas que los tratamientos con dos y cinco compuestos, mientras que los tratamientos con cuatro compuestos presentaron

menores pérdidas que los tratamientos con cinco (gráfica 5a). Los tratamientos de un solo compuestos no difieren significativamente entre sí ($F=0.285175$; $p=0.5936$), aunque es posible observar una tendencia a la formación de dos grupos, el primero con una pérdida mayor donde aparecen la cafeína, la umbelliferona y el ácido tánico, mientras que el segundo grupo incluiría a la o-vainillina, el ácido vanílico y la nicotina (gráfica 2b).

En el segundo muestreo no hubo diferencias significativas ni del número de compuestos ni de la concentración en la que se presentaron. Sin embargo resultó significativa la interacción entre ambas variables (gráfica 3). Esto se debió a que los tratamientos con seis compuestos presentaron un comportamiento distinto a las demás combinaciones. En concentraciones altas tuvieron una pérdida menor respecto a resto de los tratamientos; en concentraciones intermedias tuvieron una pérdida similar al resto de los tratamientos y presentaron una pérdida significativamente mayor a todos los demás tratamientos en concentración baja ($F=6.6871$; $p=0.01019$).

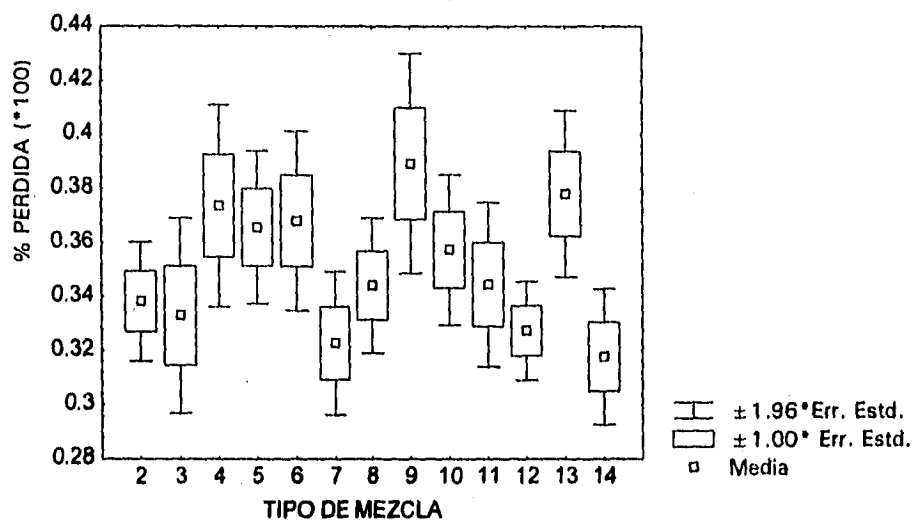
Los pares fueron los únicos que presentaron un comportamiento similar al predicho por la hipótesis, aumentando la pérdida de peso conforme disminuyó la concentración de los compuestos. Los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas ni entre el número de compuestos ni entre concentraciones de metabolitos secundarios.

GRAFICA 2a. EFECTO DEL # DE COMPUESTOS
EN EL PRIMER MUESTREO (8 DIAS)



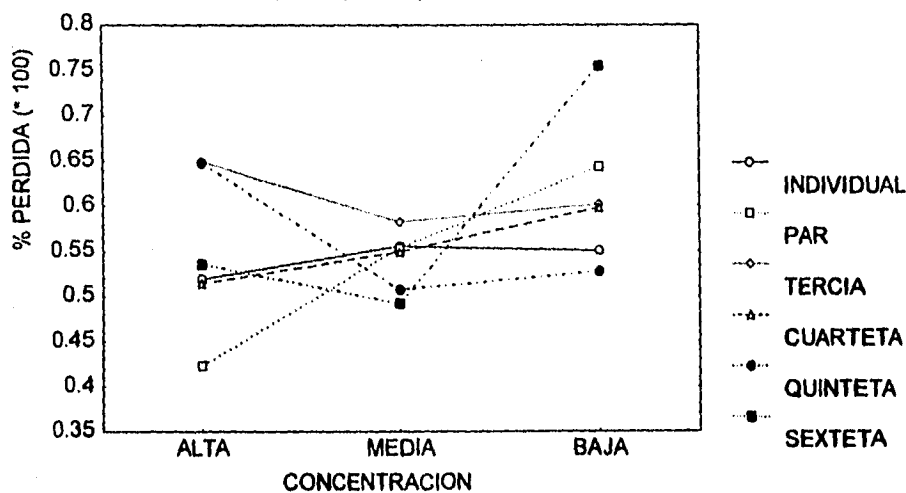
GRAFICA 2a. La tendencia a la disminución de la pérdida de peso en las cápsulas al aumentar el número de metabolitos secundarios (MS), se ve alterada por una alta pérdida de las cápsulas rellenas de harina mezclada con cinco MS. Sin embargo, el efecto del número de compuestos en la mezcla resulto significativo.

GRAFICA 2b. EFECTO DEL TIPO DE COMPUESTOS
EN EL PRIMER MUESTREO (8 DIAS)



GRAFICA 2b. A los ocho días de enterramiento, existen diferencias significativas entre las pérdidas de peso de las cápsulas que pueden ser correlacionadas con el tipo de mezcla presente en la cápsulas. Las cápsulas rellenas de harina con seis compuestos y de harina con nicotina, tuvieron las pérdidas más bajas. No existe un patrón definido en el comportamiento de las muestras. Los datos de las cápsulas con harina sola fueron excluidos por presentar errores estándares demasiado grandes que enmascaraban el resto de los datos.

GRAFICA 3. INTERACCION EN EL SEGUNDO MUESTREO
 ENTRE LA CONCENTRACION Y EL # COMPUESTOS
 $F(10,290)=1.93; p<.0405$



GRAFICA 3. Interacción en el segundo muestreo de la concentración y el número de compuestos. Esta interacción resultó estadísticamente significativa ($p=0.01019$). Los tratamientos con uno, dos, y cuatro compuestos se comportaron de acuerdo a la hipótesis. Los tratamientos con tres y cinco compuestos tuvieron su menor pérdida en la concentración intermedia, mientras que en concentraciones altas t bajas, tuvieron pérdidas semejantes. Finalmente, los tratamientos con seis compuestos tuvieron también un comportamiento acorde con la hipótesis, aumentando la pérdida de peso de las cápsulas conforme disminuyó la concentración. En el caso de la sexteta en baja concentración, la pérdida es notablemente mayor que en todos los demás tratamientos, lo cual sugiere que los metabolitos secundarios pudieron estar de manera individual, por debajo del nivel de concentración mínimo para tener efecto sobre el crecimiento de los hongos.

Los valores del eje de las Y's se multiplican por cien. Excluída la harina sola por tener errores estándares que enmascaran resultados. $F(10,290) = 1.93; p < .0405$.

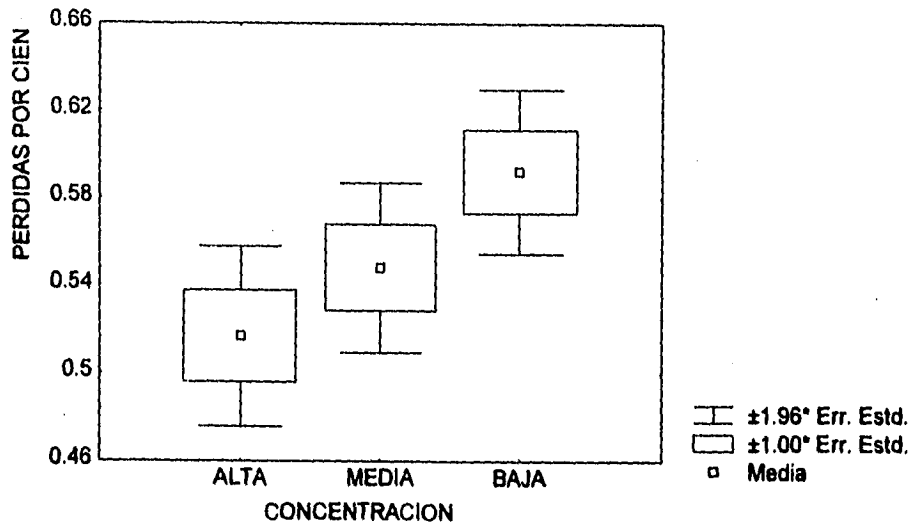
Tabla 4. Resultados de ANDEVA de dos vías con número de compuestos y concentraciones como factores. 1.- número de compuestos, 2.- concentración, 12.- interacción. Efectos significativos a P menores de 0.05 (*).

Muest	Efecto	df ef	MS ef	df err	MS err	F	nivel p
1	1*	5	.0171	369	.00710	2.4155	.03572
	2	2	.00342			.48244	.61766
	12	10	.00491			.69231	.73175
2	1	5	.03050	290	.39919	.76404	.57636.
	2	2	.09837			2.4642	08685
	12*	10	.07721			1.9343	.04049
3	1	5	.04953	365	.03381	1.4647	.20058
	2	2	.07086			2.0953	.1245
	12	10	.02898			.85716	.57382
4	1	5	.05892	360	.03322	1.7734	.11747
	2	2	.01022			.30773	.73530
	12	10	.03836			1.1545	.32067
5	1	5	.02618	382	.01766	1.4829	.19439.
	2	2	.00073			.04157	95928
	12	10	.01693			.95850	.47941

5.2.- Segundo análisis.

El segundo análisis fué un ANDEVA de dos vías, teniendo al tipo de compuestos y a la concentración como variables independientes y a la pérdida de peso de las cápsulas como variable dependiente. El análisis mostró un efecto significativo en la concentración (tabla 5 y gráfica 4), donde se observó un comportamiento como el predicho en la hipótesis, para todos los tratamientos;

GRAFICA 4. PORCENTAJES DE PERDIDA A LOS 14 DIAS
DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACION



GRAFICA 4.- Efecto de la concentración sobre la pérdida de peso de la cápsulas a los catorce días. A menor concentración, mayor pérdida de peso. Este comportamiento corresponde con lo predicho por la hipótesis, y se presenta solamente en este muestreo.

La harina sola fué excluída por cuestiones estadísticas. El bajo número de réplicas del tratamiento sin metabolitos secundarios desbalancea el análisis.

Tabla 5. Resumen de todos los efectos segundo muestreo.

ANOVA dos vías. 1-concentración, 2-tipo de compuesto.

Efecto	Efecto df	Efecto MS	F	Nivel p
*1	2	.085662	3.83363	.024328
2	12	.040949	1.83259	.050169
1*2	24	.02352	1.05263	.40797

Error df: 120; Error MS: 0.022345

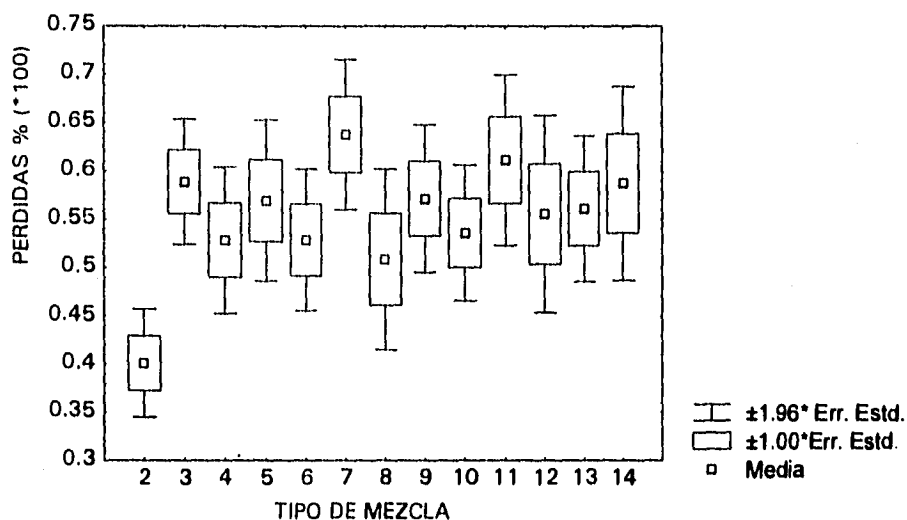
al aumentar la pérdida de peso de las cápsulas conforme disminuyó la concentración de los metabolitos secundarios. En este muestreo apareció marginalmente significativo el efecto del tipo de compuesto; en la gráfica 5 se observa que las cápsulas con tratamientos de o-vainillina presentaron una pérdida ligeramente menor respecto a las cápsulas que contenían ácido vainílico, umbelliferona, nicotina, cafeína + ácido tánico, y los tratamientos con tres, cinco y seis compuestos. Todos los demás tipos de compuestos presentaron pérdidas dentro de un mismo rango y forman un grupo estadísticamente homogéneo.

En los demás muestreos no aparecen efectos significativos.

5.3.- Tercer análisis.

Se realizó un ANDEVA de un sola vía para cada fecha de muestreo,

GRAFICA 5. PERDIDAS ASOCIADAS AL TIPO DE MEZCLA DE MS A LOS CATORCE DIAS



GRAFICA 5. Pérdidas de peso de las cápsulas de harina mezclada con diferentes combinaciones de metabolitos secundarios en el segundo muestreo. Los valores del eje Y se multiplican por 100. En la gráfica fué excluída harina sola por distorcionar los resultados al tener errores estándares muy grandes. Los combinaciones, que aparecen en el eje de las X's son los siguientes:

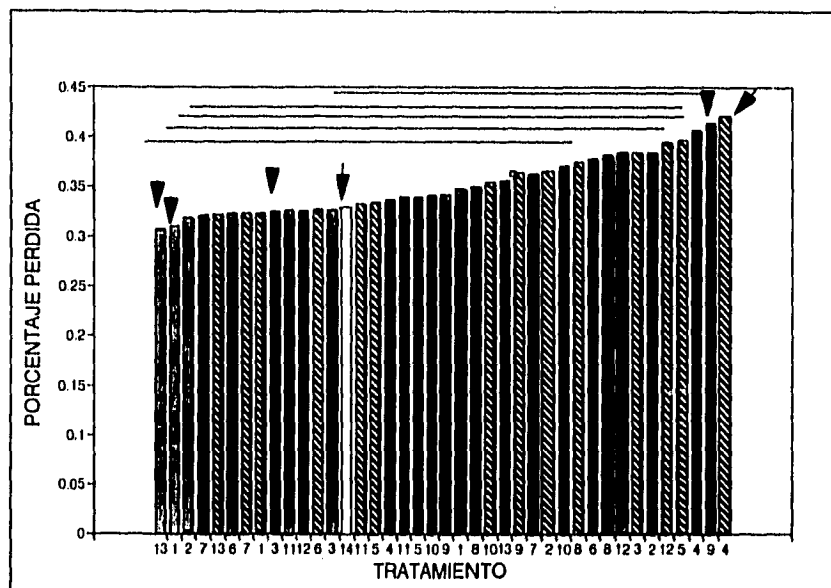
2.-o-vainillina (N=24); 3.-ácido vainílico (N=24); 4.-cafeína (N=23); 5.-umbelliferona (N=24); 6.-ácido tánico (N=23); 7.-nicotina (N=23); 8.-cafeína + o-vainillina (N=25); 9.-cafeína + ác. tánico (N=24); 10.-cafeína + umbelliferona (N=24); 11.-tercia (N=24); 12.-cuarteta (N=24); 13.-quinteta (N=24); 14.-sexteta (N=24).

teniendo los distintos tratamientos como la variable independiente y la pérdida de peso de las cápsulas como variable dependiente. Fueron cuarenta los tratamientos utilizados en la variable independiente, siendo cada uno de ellos la combinación de una de las trece mezclas de metabolitos secundarios en una de las tres concentraciones, más la harina sola. En este análisis se encontraron efectos altamente significativos en cada uno de los muestreos (tabla 6).

En el primer muestreo (gráfica 6) realizado después de 8 días de enterramiento, se obtuvieron cinco grupos con pérdidas estadísticamente homogéneas. La sexteta y la o-vainillina presentaron, junto con otros veintisiete tratamientos, diferencias significativas respecto a los 11 tratamientos restantes: cafeína + ácido tánico 2 mg/g; cafeína + ácido vainílico 0.5 mg/g; cafeína + ácido tánico 4 mg/g; cafeína 2 mg/g; ácido vainílico 2 mg/g; quinteta 2 mg/g; nicotina 2 mg/g; umbelliferona 0.5 mg/g; cafeína 0.5 mg/g y umbelliferona 2 mg/g. Es ésta última, la umbelliferona 2 mg/g, el único tratamiento que resultó diferente a todos los demás al tener una pérdida significativamente superior. La harina sola que fue utilizada como testigo presentó una pérdida similar a veintinueve tratamientos.

En el segundo muestreo, realizado a los catorce días (gráfica 7) aparecen cinco grupos con pérdidas estadísticamente similares. La o-vainillina 2 mg/g es el tratamiento que presentó una menor pérdida, seguido por el ácido vainílico 0.5 mg/g, aunque estos tratamientos no difieren en forma estadísticamente significativa de otros 27. El tratamiento con la mayor pérdida fue la harina sola.

Sin embargo, dicha pérdida no difiere estadísticamente hablando, a la de



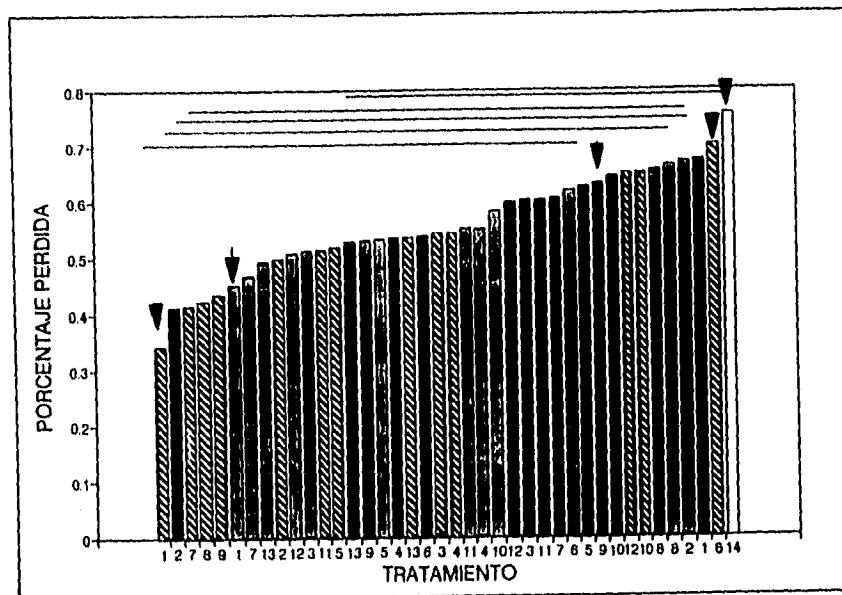
GRAFICA 6 PERDIDA DE PESO DE LOS TRATAMIENTOS A LOS SIETE DIAS. En el primer muestreo, no existe gran diferencia entre los grupos. El primer grupo contiene a varios tratamientos que tuvieron pérdidas menores en concentraciones altas. La falta de diferencias estadísticas manifiestas entre tratamientos en concentraciones altas y los mismos en concentraciones bajas o intermedias, no permite apoyar la hipótesis, aunque sí marca una tendencia en ese sentido. Las líneas horizontales marcan grupos estadísticamente homogéneos.

Aparecen señalados de derecha a izquierda, sexteta 4 mg/g; o-vainillina 4 mg/g; o-vainillina 2 mg/g; harina sola (N=10); cafeína + ácido tánico 0.5 mg/g y cafeína 0.5 mg/g.

Los valores del eje de las Y's se multiplican por cien.

Concentraciones: sin sus. quím. □ alta ▨ media ▩ baja ■

TRATAMIENTOS: 1.-o-vainillina (N=30); 2.-ácido vainílico (N=28); 3.-cafeína (N=29); 4.-umbelliferona (N=30); 5.-ácido tánico (N=29); 6.-nicotina (30); 7.-cafeína + o-vainillina (N=30); 8.-cafeína + ácido tánico (N=28); 9.-cafeína + ácido vainílico (N=31); 10.-tercia (N=31); 11.-cuarteta (N=32); 12.-quinteta (N=30); 13.-sexteta (N=30); 14.-harina sola (N=10).



GRAFICA 7 PERDIDAS DE LOS TRATAMIENTOS A LOS TRECE DIAS. En este muestreo es donde aparecen mayores diferencias entre los distintos grupos integrados por tratamientos estadísticamente iguales -marcados con las líneas horizontales en la parte superior de la gráfica. Es también, el único muestreo donde el tratamiento con la pérdida mayor es la harina sola, como lo predijo la hipótesis. El comportamiento de los demás tratamientos no corresponde a la predicho por la hipótesis, al tener varios de los tratamientos con pérdidas menores, concentraciones medias e incluso bajas.

Aparecen marcados de izquierda a derecha, o-vainillina 2 mg/g, o-vainillina 4 mg/g, cafeína 0.5 mg/g, ácido vainílico 2mg/g y harina sola. Los valores del eje de las Y's se multiplican por cien.

Concentraciones: sin MS alta media baja

TRATAMIENTOS: 1.-o-vainillina (N=24); 2.-ácido vainílico (N=24); 3.-cafeína (N=23); 4.-umbelliferona (N=24); 5.-ácido tánico (N=23); 6.-nicotina (N=23); 7.-cafeína + o-vainillina (N=25); 8.-cafeína + ácido tánico (N=24); 9.-cafeína + umbelliferona (N=24); 10.-tercia (N=24); 11.-cuarteta (N=23); 12.-quinteta; 13.-sexteta (N=23); 14.-harina sola (N=8).

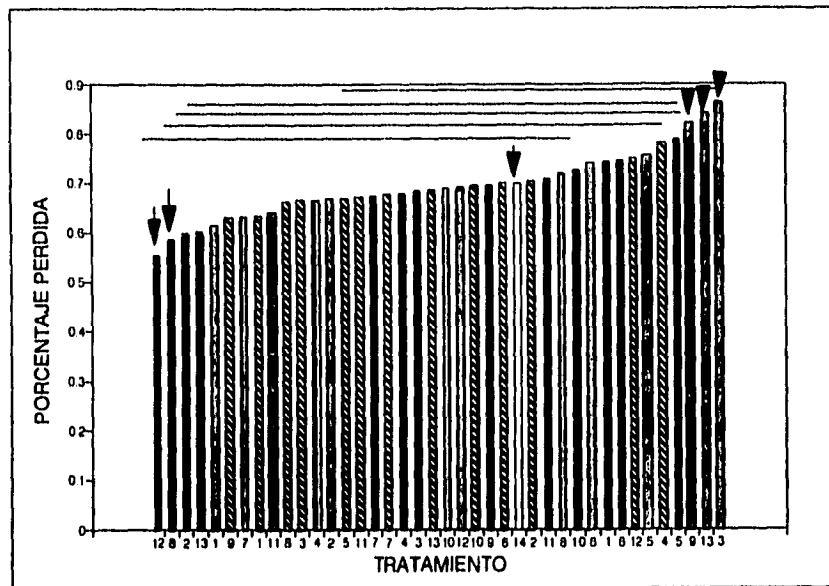
otros veintiseis tratamientos, siendo estadísticamente distinta a trece tratamientos.

Tabla 6. Análisis de varianza de los cinco muestreos.
ANOVA una vía con efectos marcados con p menor a 0.05.

Mstr	Efecto SS	Efe df	Efec. MS	Error SS	Err. df	Err. MS	F	p
1	9905	40	247.67	2.436	357	.007	36293	.00
2	9860	40	246.51	10.78	276	.039	6309	.00
3	9839	40	245.96	11.49	353	.032	7558	.00
4	9816	40	245.39	11.32	347	.032	7524	.00
5	9810	40	245.25	6.54	370	.018	13875	.00

En el tercer muestreo, realizado después de 20 días de enterramiento, se obtuvieron cinco grupos estadísticamente homogéneos en cuanto a pérdida de peso (gráfica 8).

El tratamiento que presentó la menor pérdida es la quinteta 0.5 mg/g, seguido de la cafeína 0.5 mg/g y del ácido vainílico 0.5 mg/g. Estos tratamientos se encuentran en el primer grupo homogéneo junto con otros



GRAFICA 8 PERDIDA DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 20 DIAS. Existe poca diferencia entre los distintos grupos de tratamientos con pérdidas estadísticamente iguales -señalados con las líneas horizontales en la parte superior de la gráfica. El comportamiento de los tratamientos no corresponde al predicho por la hipótesis. Cuarteta 2 mg/g, cafeína + ácido tánico 2 mg/g y o-vainillina 2 mg/g presentan pérdidas bajas. Harina sola y quinteta 2 mg/g presentan las pérdidas más altas. Los valores del eje de las Y's se multiplican por cien.

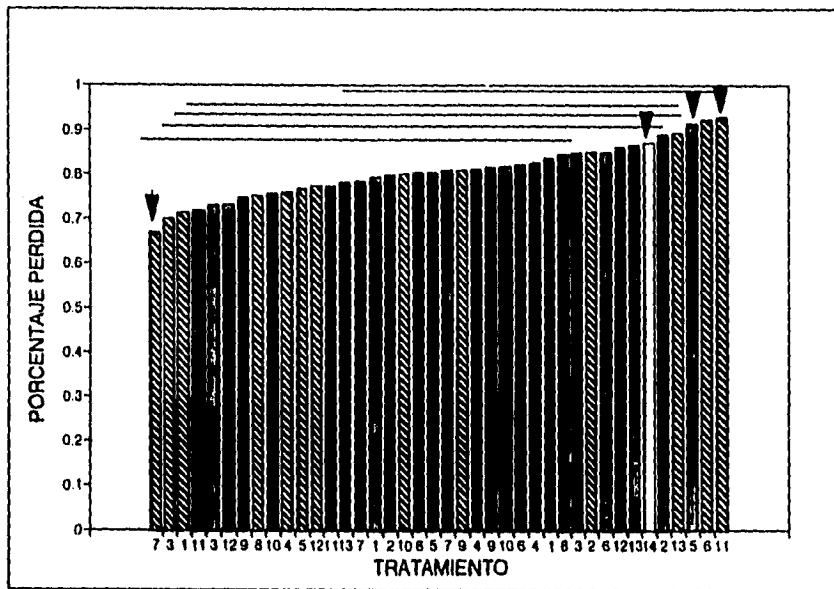
concentraciones sin MS alta media baja

TRATAMIENTOS: 1.-o-vainillina (N=28); 2.-ácido vainílico (N=31); 3.-cafeína (N=29); 4.-umbelliferona (N=31); 5.-ácido tánico (N=30); 6.-nicotina (N=30); 7.-cafeína + o-vainillina (N=29); 8.-cafeína + ácido tánico (N=30); 9.-cafeína + umbelliferona (N=30); 10.-tercia (N=31); 11.-cuarteta (N=29); 12.-quinteta (N=29); 13.-sexteta (N=28); 14.-harina sola (10).

veintisiete. Los tratamientos que presentaron mayores pérdidas son el par cafeína + umbelliferona 4 mg/g, la sexteta 4 mg/g y la cafeína 4 mg/g. Estos tres tratamientos pertenecen al último grupo homogéneo, del cual forman parte otros veintitres tratamientos. Existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos con pérdidas menores y los tres tratamientos con pérdidas mayores.

En el cuarto muestreo, realizado después de 26 días de enterramiento, se obtuvieron cinco grupos con pérdidas estadísticamente homogéneas (gráfica 9). El tratamiento de menor pérdida fue el par cafeína + o-vainillina, seguido por la cafeína y la o-vainillina, todos en concentraciones de 2 mg/g. El tratamiento de mayor pérdida fue la cuarteta, también en concentración de 2 mg/g. Los tres primeros pertenecen a un grupo homogéneo junto con otros treinta tratamientos. Los de mayor pérdida pertenecen a un grupo homogéneo de 26 tratamientos. El tratamiento de harina sola se encuentra cargado hacia la zona de mayor pérdida difiriendo solamente de los primeros tres tratamientos del primer grupo homogéneo. Existe un grupo de 13 tratamientos estadísticamente iguales, donde se incluye la harina sola, que es el que tiene la menor pérdida de peso.

En el quinto muestreo (treinta y dos días de enterramiento) nuevamente aparecen cinco grupos con pérdidas estadísticamente homogéneas (gráfica 10). El grupo con pérdidas menores incluye a 29 tratamientos entre los que se encuentra la harina sola. El tratamiento con pérdida menor es el de cafeína + o-vainillina 4mg/g, seguida por la tercia y por la cafeína, también en



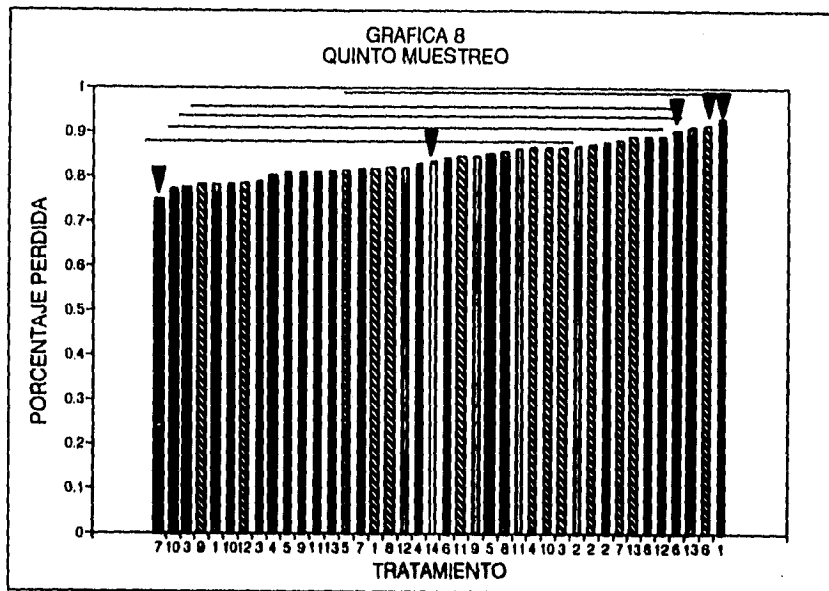
GRAFICA 9 PERDIDA DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 26 DIAS. No aparece patrón alguno en el comportamiento de los datos; por lo tanto, la hipótesis no se cumple. Los tratamientos estadísticamente homogéneos, forman grupos que se señalan con las líneas horizontales de la parte superior de la gráfica.

Aparecen de izquierda a derecha cafeína + o-vainillina 2 mg/g, harina sola, nicotina 4 mg/g y tercia 4 mg/g. El primer tratamiento señalado es el de menor pérdida, mientras que los dos últimos son los de pérdidas mayores. La harina sola es el control.

Los valores del eje de las Y's se multiplica por cien.

Concentraciones sin MS alta media baja

TRATAMIENTOS: 1.-o-vainillina (N=29); 2.-ácido vainílico (N=30); 3.-cafeína (N=30); 4.-umbelliferona (N=28); 5.-ácido tánico (N=30); 6.-nicotina (N=29); 7.-cafeína + o-vainillina (N=28); 8.-cafeína + ácido tánico (N=29); 9.-cafeína + umbelliferona (N=30); 10.-tercia (N=30); 11.-cuarteta (N=29); 12.-quinteta (N=28); 13.-sexteta (N=29); 14.-harina sola (N=9).



GRAFICA 10 PERDIDAS DE LOS TRATAMIENTOS A LOS 32 DIAS. Los datos de este muestreo no presentan ningún patrón definido. La hipótesis no se cumple ni siquiera de manera parcial. Los datos de pérdida de peso de las cápsula con distintos tratamientos, forman grupos estadísticamente homogéneos, los cuales se señalan con las líneas horizontales de la parte superior de la gráfica.

Aparecen marcados de izquierda a derecha nicotina 4 mg/g, harina sola, cafeína + ácido tánico 4 mg/g, cafeína + o-vainillina 2 mg/g y o-vainillina 0.5 mg/g. El primer tratamiento señalado es el de pérdida menor, mientras que los últimos tres tratamientos señalados están entre los de mayor pérdida. La harina funcionó como control.

Los valores del eje de las Y se multiplican por cien.
 concentraciones: sin MS □ alta ■ media ▨ baja ■
 TRATAMIENTOS: 1.-o-vainillina (N=31); 2.-ácido vanílico (N=30); 3.-cafeína (N=30); 4.-umbelliferona (N=30); 5.-ácido tánico (M=30); 6.-nicotina (N=30); 7.-cafeína + o-vainillina (N=31); 8.-cafeína + ácido tánico (N=32); 9.-cafeína + umbelliferona (N=32); 10.-tercia (N=31); 11.-cuarteta (N=32); 12.-quinteta (N=29); 13.- sexteta (N=29); 14.-harina sola (10).

concentraciones de 4 mg/g. Los tratamientos con pérdidas mayores son caféina + ácido tánico 2 mg/g y la o-vainillina 0.5 mg/g, los cuales se presentan en un grupo estadísticamente homogéneo de 27 tratamientos.

No hubo un patrón de respuestas claras a lo largo del experimento, especialmente después del segundo muestreo. Los tratamientos que disminuyeron la pérdida de peso de las cápsulas en cierto muestreo, no son los mismos en el siguiente. Un caso claro de esto es la harina sola, que teniendo pérdidas medias en la mayoría de los tratamientos presenta la menor pérdida en el segundo muestreo.

6.- DISCUSION

Los datos obtenidos no apoyan la hipótesis de trabajo -plantas con defensas químicas más complejas estarían mejor defendidas que plantas con defensas químicas menos complejas. Así lo demuestra la inconsistencia de los datos desde los dos primeros muestreos. El resto de los muestreos no presenta un patrón definido y la inconsistencia de los datos aumenta.

Los ANDEVA de dos vías detectaron efectos significativos en los dos primeros muestreos exclusivamente, en el primer muestreo este efecto se debió al número de compuestos y en el segundo muestreo, a la concentración de los compuestos y a la interacción entre concentración y número de compuestos utilizados.

En el primer muestreo las cápsulas con pérdidas de peso menores fueron las tratadas con la sexteta, seguidas por la nicotina, la quarteta, el ácido vainílico y la o-vainillina. Las pérdidas mayores las presentaron las cápsulas con tratamientos de cafeína + ácido tánico y la quinteta. Existe un grupo de pérdidas intermedias que incluye a los demás tratamientos. En el segundo muestreo las cápsulas con harina sola fueron las que tuvieron la pérdida mayor en términos absolutos, aún cuando estadísticamente no se diferencian de un gran número de otros tratamientos. En este muestreo se demostró también que la pérdida de peso disminuía conforme aumentaba la concentración de los metabolitos secundarios, apoyando ligeramente nuestra hipótesis. Esto sugiere, junto con los datos del primer muestreo, que la presencia de algún metabolito

secundario o combinación de metabolitos resulta benéfico en etapas iniciales de colonización al interferir con el desempeño de los hongos. Esto resulta interesante si recordamos la hipótesis de la defensa óptima (Fagerström *et al.* 1987), según la cual, a una planta le resultará mejor no presentar defensa si el daño que le genera un herbívoro es menor que el costo de producir las defensas requeridas. Según nuestros datos, al enfrentarse la planta a una comunidad de herbívoros, el consumo será mayor en ausencia de defensa que en presencia de alguna sustancia. Si tomamos en cuenta que en la naturaleza la mayor parte de las plantas tienen más de un consumidor, entonces las que posean alguna defensa resultarán beneficiadas por la selección natural, aún cuando la elaboración de la defensa represente un gasto. De esta manera, la cantidad de metabolitos secundarios presentes (solos o en mezcla) parece ser importante. El hecho de que en un muestreo donde resultan significativos el número de compuestos y la concentración de los mismos (segundo muestreo), la menor pérdida de todos los tratamientos se da en la cápsulas de la sexteta 4 mg/g, y la mayor pérdida de todos los tratamientos se da en las cápsulas con el tratamiento sexteta 0.5 mg/g, indica que los metabolitos secundarios actúan con base en la concentración. Además, parece existir un nivel de concentración crítica debajo del cual, dejan de tener efecto alguno estos metabolitos secundarios. Por otro lado el hecho de que la mayor pérdida se da en la sexteta a baja concentración y que ésta sea mucho mayor que la de otros tratamientos en la misma concentración, indica que el efecto de las combinaciones de metabolitos no es igual a la de los metabolitos de manera individual.

A partir del tercer muestreo deja de haber patrones en los datos. El hecho de que no existan patrones claros en los primeros dos muestreos y que a partir del tercero no se encuentre ningún dato relevante puede tener varias explicaciones no excluyentes:

a) existe una heterogeneidad en la distribución y abundancia de los hongos en el suelo. La importancia de esto ha quedado demostrada por Robertson & Freckman (1995) para otros grupos como los nemátodos. En este trabajo los autores demostraron la existencia de abundancia y distribuciones muy heterogéneas tanto intra como intergremiales en poblaciones de nemátodos en campos maiceros del centro de los Estados Unidos, los que supuestamente son suelos muy homogéneos. En estos estudios los nemátodos fueron subdivididos según hábitos alimenticios en bacteriófagos, parásitos de plantas, omnívoros/depredadores y fungívoros. La alta heterogeneidad en la abundancia y distribución de este último grupo indica de manera indirecta, una heterogeneidad de distribución y abundancia en los propios hongos, que depende de la escala. De existir ésta en campos de cultivo altamente tecnificados como son los del medio oeste norteamericano, es de esperarse que sea aún mayor o al menos igual, en campos menos manipulados como el utilizado en este estudio. Esta heterogeneidad pudo haberse traducido en tasas de colonización diferenciales entre matrices, aumentando los errores estándares de los datos y enmascarando los efectos de los distintos tratamientos. A pesar de que la disposición de la cápsulas en cada matriz fue aleatoria, al igual que la recuperación de matrices, esto no sería suficiente para tener una muestra que

eliminar los efectos de una distribución de los hongos tan heterogénea a gran escala.

b) Los procesos de exclusión competitiva que se dan entre los hongos. Existen hongos capaces de producir aleloquímicos que inhiben el crecimiento de otras especies (Janzen, 1977). Así, el hongo que logre penetrar a una semilla (en este caso, a una de las cápsulas) podría ser el único en degradarlo. Dada la variabilidad de las tasas de descomposición del sustrato de las distintas especies de hongos, éste podría ser un factor aún más importante que los propios tratamientos utilizados a la hora de la obtención de los resultados.

c) Degradación de las sustancias utilizadas en el proceso. Si bien tanto la identidad química de las sustancias como las concentraciones de las mismas quedaron establecidas al inicio del experimento, posteriormente los metabolitos secundarios se desnaturalizan en el suelo debido a la acción de los microorganismos (Kumar *et al.*, 1993; Kinkel *et al.* 1987). Kumar *et al.* (*op. cit*) demostraron que los hidroximatos cíclicos y las aminofenoxazinonas oxiladas producidas por el maíz y el trigo son degradados en el suelo por hongos y bacterias. Los productos de la acción de estos microorganismos pueden resultar, en ocasiones, más fitotóxicos que los originales. Hoagland & Williams (1988) demostraron que los exudados de las raíces de las plantas alteran la composición de la comunidad de microorganismos de la rizósfera y estos cambios, al alterar las importancias relativas de las distintas especies, generan después cambios en la química de los propios exudados. Además, a cualquier tasa de descomposición, llega el momento en que la cantidad del compuesto

intacto esté por debajo de la cantidad requerida para tener algún efecto. Cuando esto sucede, los microorganismos crecen más rápido y las diferencias entre tratamientos desaparecen. Además de las acciones de microorganismos, hay que tomar en cuenta la degradación de los metabolitos secundarios que tiene un origen abiótico, especialmente oxidación por acción del agua o aire.

d) La presentación de los metabolitos secundarios (MS) a la comunidad de hongos consumidores. En la naturaleza, las sustancias químicas con propiedades defensivas se encuentran localizadas en ciertas partes de las plantas. En el caso de las semillas suelen estar en la testa o en las ornamentaciones de las mismas. Estas son, capas relativamente delgadas, así que la utilización en este trabajo de concentraciones en base al peso total, pudo haber originado que la calidad fuera diferente a las que las semillas presentan de manera natural, aún siendo cuantitativamente iguales. De ser cierto esto se utilizaron concentraciones mucho más bajas que las que se presentan en la naturaleza. Los metabolitos secundarios se ofrecieron a la comunidad de consumidores en una distribución homogénea cuando en la naturaleza se presentan ligados a la pared celular. Esta condición permitió que los MS entraran en contacto más estrecho con las estructuras invasoras de los hongos, y quizás esto contribuyó a retardar la descomposición de las sustancias.

7.- CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados no apoyan la hipótesis. Sin embargo, por los datos que se desprenden del primero y principalmente del segundo muestreo, tampoco es posible desecharla por completo.

Con base en todos los resultados, se sugiere que para una planta, o sus partes, resultará mejor tener algún tipo de defensa, que carecer de ella, al menos durante la etapa de colonización por parte de hongos consumidores. Además, a mayor concentración de compuestos mayor protección.

Para obtener datos más claros y poder tener una postura más precisa ante la hipótesis del trabajo se sugiere lo siguiente:

- Mayor control de las variables. La heterogeneidad de la distribución y densidad de las poblaciones de hongos del suelo representó un problema. Existen dos posibles soluciones:

1) aumentar el número de repeticiones, tanto de matrices como de cápsulas, para buscar disminuir los errores estándares.

2) realizar los enterramientos en macetas, con tierra esterilizada y posteriormente inoculada, conociendo la cantidad de inóculo.

El problema de 1 es que aumenta enormemente la cantidad de trabajo; el problema de 2 es que la variabilidad de la comunidad de consumidores se vería reducida.

- Aumento de las concentraciones utilizadas si se ha de usar la presentación homogénea de los MS en las cápsulas.

- Presentar los MS a la comunidad de hongos de una manera más adecuada, es decir, concentrados en la parte externa de las cápsulas. Es posible pensar en cápsulas de dos tamaños semejantes, pero una mayor que otra. La menor contendría harina sin MS, los cuales se encontrarían en el espacio existente entre ambas cápsulas, revueltos homogéneamente con harina en concentraciones adecuadas.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. LIMUSA, México, D. F. 756 p.p.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, S. A., México, p. 190-203.
- Akin, D. E. et. al. 1988. Population changes in fibrolytic rumen bacteria in the presence of phenolic acids and plant extracts. *Anim. Feed Sci. & Tech.*, 19:261-275.
- Baldwin, I. & Huh, S. 1994. Primary function for chemical defense? Nicotine does not protect *Datura stramonium* L. from UV damage. *Oecologia*, 97:243-247.
- Baldwin, I. 1988. Damaged-induced alkaloids in tobacco: pot-bound plants are not inducible. *J. Chem. Ecol.* 15:1661-1680.
- Begon, H., Harper, J. L. & Townsend, C. R. 1986. Ecology: individuals, populations and communities. Sinauer Associates, Inc. Publishers., Massachusetts, 876 p.p.
- Berenbaum, M. 1985. Brementown revisited: Interactions among allelochemicals in plants. *Recent Adv. Phytochem.*, 19:139-169.
- Berenbaum, M. 1988. Allelochemicals in insect-microbe-plant interactions: Agrnts provocateurs in coevolutionary arms race, pp. 97-124 en P. Barbosa & D.K. Letourneau (eds.). Novel Aspects of Insect-Plant Interactions. John Wiley & Sons, New York.
- Berenbaum, M. & Zangler L. 1992. Genetics of secondary metabolism and herbivore resistance in plants, pp.415-438 en G. A. Rosenthal & M. Berenbaum (eds.) Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, Vol.2, Ecological and Evolutionary Processes. Academic Press, New York.
- Berenbaum, M. R., Nitao, J.K., & Zangler, A. R. 1991. Adaptative significance of furanocoumarin diversity in *Pastinaca sativa* (Apiaceae), *J. Chem. Ecol.*, 17:207-215.

- Bernays, E. A. 1978. Tannins. An alternative view point. *Entomol. Exp. Appl.*, 24:44-53.
- Bernays, E. A. & Chapman, R. F. 1987. Chemical deterrence of plants. En J.A. Law (ed.). *Molecular entomology*, vol. 49, pp. 108-116. Alan R. Liss, New York.
- Bradshaw, T. & Mortimer, M. 1986. Evolution in communities. En Kikkawa, J., D. J. Anderson (eds.). *Community Ecology*. Patterns and process. Blackwell Scientific Publications. Oxford:309-341.
- Brady, N. C. 1990. The nature and properties of soils. 10th edition. Maxwell & McMillan International Editions. New York, 621 p.p.
- Browning, A. & Frey, K. 1969. Multiline cultivars as a means of disease control. J. paper no. J-6199, *Iowa Agricultural & Home Economics Experiment Station*, Ames Iowa.
- Bryant, J. P., F. S. Chapin III, & D. R. Klein. 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, 40:357-368.
- Carroll, G. C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbiont. *Ecology* 69, 2-9.
- Choo, G. M. et. al. 1981. A simple enzyme assay for dry matter digestibility and its value in studying food selection by generalistic herbivores. *Oecologia*, 49:170-178.
- Coley, P. D., J. P. Bryant & F. S. Chapin. 1985. Resource availability and plant antiherbivory defense. *Science*, 230:895-899.
- Curl, E. & Truelove, B. 1985. The Rhizosphere. Springer-Verlag. Berlin, p. 190-198.
- Edwards, P.J. 1989. Insect herbivory and plant defense theory. En Toward a more exact ecology ed. Grubb, P. & Whittaker, J. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Edwards, P. J., W. J. Wanjura, W.V Brown. 1993. Selective herbivory by Christmas beetles in response to intraspecific variation in Eucalyptus terpenoids. *Oecologia*, 95:551-557.

- Ehrlich, P. & Raven, P. 1964. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*. 18:586-608.
- Espinosa-García, F. J. & Langenheim, J. H. 1991. Effects of sabinene and terpenes from coastal redwood leaves acting singly or in mixtures on the growth of some of their fungus endophytes. *Biochem. Syst. & Ecol.*, 19:643-650.
- Fangerström, T., S. Larsson, & O. Tenow. 1987. On optimal defence in plants. *Func. Ecol.* 1:73-81.
- Feeny, P. 1976. Plant apparency and chemical defense. *Recent Adv. Phytochem.*, 10: 1-40.
- Fiala, B., H. Gronsky, V. Maschivitz & K. E. Lisenmair. 1994. Diversity of ant-plant interactions: productive efficacy in *Macaranga* species with different degrees of ant association. *Oecologia* 97:186-192.
- Fox, L. 1981. Defense and dynamics in plant-herbivore systems. *Amer. Zool.* 21:853-864.
- Grubb, P.J. 1992. A positive distrust in simplicity - lessons from plant defenses and from competition among plants and among animals. *J. Ecol.* 80:585-610.
- Harborne, J. B. 1982. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press, Londres, 278 p.p.
- Haslam, E. 1988. Plant polyphenols (*syn.* vegetable tannins) and chemical defense - A reappraisal. *J. Chem. Ecol.* 14:1789-1805.
- Harms, D. A. & Mattson, W. J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quart. Rev. of Biol.*, 67(3):283-335.
- Janzen, D. H. 1977. Why fruits rot, seeds mold and meat spots. *Am. Nat.*, 111:691-713.
- Jones, C. & Firn, R. 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 333:273-280.

- Jones, C. & Lawton, J. 1991. Plant chemistry and insect species richness of British Umbellifers. *J. Chem. Ecol.* 60:767-777.
- Kinkel, L. L., Andrews, J. H., Berbee, F. M. & Nordheim, E.V. 1987. Leaves as islands for micorbes. *Oecologia*. 71:405-408.
- Kubo, I. & Hanke, F. J. 1985. Multifaceted chemically based resistance in plants. *Recent Adv. Phytochem.*, 19:171-194.
- Kumar, P. *et al.* 1993. Soil transformation of wheat and corn metabolites MBOA and DIM2BOA into aminophenoxazinones. *J. Chem. Ecol.* 19:2453-2461.
- Langenheim, J. H. 1994. Higher plants terpenoids. A phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.*, 20(6):1223-1280.
- Lewis, A. E. 1982. Bioestadística. C.E.C.S.A., México, D. F., 279 p.p.
- Loomis, W. E. 1932. Growth-differentiation balance vs. carbohydrate-nitrogen ratio. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 29:240-245.
- Loomis, W. E. 1953. Groth and differentiation - an introduction and summary. En W.E. Loomis (ed.). Growth and differentiation in Plants, pp. 1-17, Iowa State College Press.
- Lorio, P. L. Jr. 1986. Groth differentiation balance: a basis for understanding souther pine beetle-tree interactions. *For. Ecol. Manage.*, 14:259-273.
- Lorio, P. L. Jr. 1988. Growth and differentiation-balance relationships in pines affect their resistance bark beetles (Coleoptera: Scolitydae). En W. J. Mattson, J. Levieux & C. Bernard-Dagan (eds.). Mechanisms of Woody Plants Defenses Against Insects: Search for Pattern. pp. 73-92. Sprinverg-Verlag, New York.
- McKey, D. 1974. Adaptative patterns in alkaloid physiology. *Am.Nat.*, 108:305-320.
- Mihaliak, C. A., J. Gershenzon, & R. Croteau. 1991. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants: implications for theories of plant defense. *Oecologia*, 87:373-376.
- Mikulasova, M. *et al.* 1990. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass*.23:149-154.

- Moore, R. et al. 1991. Herbivory by insects on oak trees in pure stands compared with paired mixtures. *J. App. Ecol.* 28:290-304.
- Namkoong, G. 1991. Maintaining genetic diversity in breeding for resistance in forest trees. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29:325-342.
- Nichols-Orians, C. 1991 a. Condensed tannins, attine ants, and the performance of a symbiotic fungus. *J. Chem Ecol.* 17:1177-1818.
- Nichols-Orians, C. 1991 b. Differential effects of condensed and hydrolyzable tannin on polyphenol oxidase activity of attine symbiotic fungus. *J. Chem. Ecol.* 17:1811-1819.
- Pellissier, F. 1993. Allelopathic effect of phenolic acids from humic solutions on two spruce mycorrhizal fungi: *Cenococcum graniforme* and *Laccaria laccata*. *J. Chem. Ecol.* 19:2105-2114.
- Rhoades, D. F. & Cates, R. G. 1976. Toward a general theory of plant antiherbivory chemistry. *Recent Adv. Phytochem.*, 10:168-213
- Rhoades, M. J. C. 1985. The physiological significance of plant phenolic compounds. En C. F. Van Sumere & P. J. Lea (eds.) *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, vol. 25, The Biochemistry of Plant Phenolics, pp. 99-117. Clarendon Press, Oxford.
- Robertson, P. & Freckman, D. W. 1995. The spatial distribution of nematodii trophic groups across a cultivated ecosystem. *Ecology*, 76(5):1425-1432.
- Robinson, T. 1974. Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science*, 184:430-435.
- Shafer, S. & Blum, U. 1991. Influence of phenolic acids on microbial populations in the rhizosphere of cucumber. *J. Chem. Ecol.* 17:369-389.
- Snook, M., Csinos, A. S., Chortyk, O. K. 1992. Inhibition of growth of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* by aromatic acids and coumarins in a laboratory bioassay. *J. Chem. Ecol.*, 1287-1299
- Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 28:479-501

59
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Swain, T. 1979. Tannins and lignins. Pgs. 657-682, en Rosenthal, G. A. y D. H. Janzen (ed.). Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press, New York.
- Tuomi, J., P. Niemela, & S. Sirén. 1990. The Panglosian paradigm and delayed inducible accumulation of foliar phenolics in mountain birch. *Oikos*, 59:339-410.
- Van der Plank, J. E. 1963. Plant diseases: Epidemics and control. Academic Press, New York, 349 p.p.
- Van der Plank, J. E. 1968. Disease Resistance in Plants. Academic Press, New York, 206 p.p.
- Vasconcelos, H.L. 1993. Ant colonization of *Maieta guianensis* seedlings, an Amazon ant-plant. *Oecologia*, 95:439-444.
- Zangler, A. R. & Berenbaum, M. R. 1990. Furanocoumarins in wild parsnip: genetics and populational variation. *Ecology*, 71:1933-1940.
- Zucker, W. 1983. Does structure determines function? An ecological perspective. *The Am. Nat.* 121(3):335-365.